

DEVICE OF MEASURING FREE LIGAND IN BODY FLUID

Patent number: JP10221341 Reference 3
Publication date: 1998-08-21
Inventor: FUKUI HIDEO; SAKABE MASAHIRO
Applicant: MITSUI CHEMICALS INC
Classification:
- international: G01N33/53; G01N33/543
- european:
Application number: JP19970020381 19970203
Priority number(s): JP19970020381 19970203

[View INPADOC patent family](#)

Abstract of JP10221341

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a measuring method of the concentration of free ligands in a body fluid, which is important for the diagnosis of various diseases, with no effect of endogenous ligand receptors with more accuracy than before. **SOLUTION:** In a 2-step competitive immunoassay known as a measuring method of free ligands in a body fluid, by using a natural substance on the synthesizing and metabolic pathway of ligands in a living body and a chemically modified derivative as a substance to be labeled, the displacement action between ligands once bound to a solid-phase antibody, which causes reduction in measurement accuracy, and labeled ligands is reduced.

Reference 3

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-221341

(43)公開日 平成10年(1998)8月21日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 33/53
33/543

識別記号

5 1 5

F I

G 0 1 N 33/53
33/543

E

33/543

5 1 5 N

審査請求 未請求 請求項の数7 O.L (全8頁)

(21)出願番号 特願平9-20381

(22)出願日 平成9年(1997)2月3日

(71)出願人 000005887

三井化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72)発明者 福井 英雄

千葉県茂原市東郷1900番地の1 三井東圧
化学株式会社内

(72)発明者 坂部 雅弘

千葉県茂原市東郷1900番地の1 三井東圧
化学株式会社内

(54)【発明の名称】 体液中の遊離リガンドの測定方法

(57)【要約】

【課題】各種疾病の診断上重要な体液中の遊離リガンド濃度を内因性リガンド受容体の影響を受けずに従来よりも精度良く測定する方法を提供すること。

【解決手段】 体液中の遊離リガンドを測定する方法として知られている2ステップ競合免疫測定法において、リガンドの生体内における合成及び代謝経路上の天然物や化学的修飾を施した誘導体を被標識物質として使用することで、測定精度低下の原因である固相上の抗体と一旦結合したリガンドと標識リガンドの置換反応を低減する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】測定対象のリガンドが内因性受容体と結合した形及び遊離の形で混在している試料中の遊離リガンドを測定する方法において、リガンドに対する抗体を不溶化した固相と試料溶液を混合し、試料中の遊離リガンドを固相上の抗体と反応させた後、洗浄操作により試料中の内因性受容体と結合しているリガンドを除去し、次に不溶化した抗リガンド抗体に対する親和性が遊離リガンドよりも低い標識したリガンドの同族体を固相と接触させて固相上の抗体と結合させ、続いて洗浄操作を行い未反応の標識試薬を除去し、固相上に結合した標識量を測定することにより体液中の遊離リガンドを定量測定する方法。

【請求項2】標識されるリガンドの同族体はリガンドの生体内における合成及び代謝経路上の天然物である請求項1記載の方法。

【請求項3】標識されるリガンドの同族体は化学的な修飾を施したリガンドである請求項1記載の方法。

【請求項4】リガンドは3, 5, 3'-レートリヨードサイロニン、標識される同族体がジヨードサイロニンである請求項2記載の方法。

【請求項5】リガンドはサイロキシン、標識される同族体が3, 5, 3'-レートリヨードサイロニンである請求項2記載の方法。

【請求項6】同族体を標識する物質が西洋ワサビペルオキシダーゼである請求項3、請求項4又は請求項5記載の方法。

【請求項7】抗体を不溶化する固相が磁性微粒子である請求項6記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、各種疾病的診断に有用とされる体液中の遊離リガンドの免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】測定対象のリガンドが内因性受容体と結合した形及び遊離の形で混在している試料中の遊離リガンドの免疫測定方法に関しては、特公昭63-11627号公報に記載されている2ステップ競合免疫測定法がある。この方法は、容器の内表面の固相に塗布された外因性リガンド受容体と試料中の遊離リガンドを反応させた後、洗浄操作により試料中の内因性受容体に結合したリガンドを除去し、次にリガンドをラジオアイソトープ標識した標識試薬を加え固相上の未反応の外因性リガンド受容体と結合させ、続いて洗浄操作を行い未反応の標識試薬を除去し、固相上の標識量を測定することにより試料中のリガンドを定量測定するものである。しかし、この方法は、外因性受容体に対する親和性が遊離リガンドよりも一般的に強いか同等の標識リガンドを使用している。この結果、固相上に不溶化した外因性受容体に結合

した試料中遊離リガンドと標識リガンドの置換反応を生じる。この為、固相上の標識量が真の量よりも多くなり、測定精度が低下するという欠点があった。

【0003】別な方法として、1ステップ競合免疫測定法が特公昭63-7621号公報や特表平3-502243号公報に記載されている。特公昭63-7621号公報には、試料中の内因性リガンド受容体への結合力が全くないか非常に弱い標識リガンドと試料中のリガンド及び外因性リガンド受容体を同時に混合し競合反応を行わせて、遊離リガンドを定量測定する方法が記載されている。この方法は、内因性リガンド受容体への結合性が全くないか非常に弱く且つ外因性リガンド受容体への結合能のある標識物を使用することで、内因性リガンド受容体濃度の影響を受けずに遊離リガンドを測定することが可能であり、被標識物としてリガンドのアミノ基やカルボン酸などに化学修飾を施した誘導体や、リガンドの立体配置をL体からD体とする異性体をあげている。しかしながら、この方法の問題点は、実際には内因性リガンド受容体の影響を完全に排除できないことである。従って、試料中のアルブミン濃度や自己抗体の影響により異常値を示す欠点があった。特表平3-502243号公報は、遊離リガンドを含む試料、アイソトープなどで標識したリガンドに対するモノクローナル抗体及び標識した抗リガンド抗体に対する親和性が遊離リガンドよりも低いリガンドの同族体を不溶化した固相の三者を同時に混合し競合反応を行わせて、遊離リガンドを定量測定する方法が記載されている。この方法は、内因性リガンド受容体濃度の影響を受けずに遊離リガンドを測定することが可能とされている。しかしながら、1ステップ競合免疫測定法であるため、競合させるリガンド同族体は、内因性リガンド受容体への結合性が全くないか非常に弱い特性を持つように修飾する必要があった。また、これらの測定方法を用いた時の測定感度は、血清中の遊離の3, 5, 3'-レートリヨードサイロニン（以下T3と略す）濃度の測定を例に挙げると0.4~0.8pg/mIであり、臨床的に十分とはいえないかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】この発明は、各種疾病的診断上重要な体液中の遊離リガンド濃度を内因性リガンド受容体の影響を受けずに、従来よりも大幅に感度良く測定するためになされたものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、体液中の遊離リガンドを精度良く測定する方法を開発するためには、固相化抗体、リガンド及び標識リガンドを用いる2ステップ競合免疫測定法において、リガンドの生体内における合成および代謝経路上にある同族体や化学的修飾を施した誘導体を被標識物質として使用することで、固相上の抗体と一旦結合した測定対象のリガンドと標識リガンドの置換反応を低減でき、測定

精度が向上することを見いだし、本発明をなすに至った。

【0006】すなわち本発明は、測定対象のリガンドが内因性受容体と結合した形及び遊離の形で混在している試料中の遊離リガンドを測定する方法において、リガンドに対する抗体を不溶化した固相と試料溶液を混合し、試料中の遊離リガンドを固相上の抗体と反応させた後、洗浄操作により試料中の内因性受容体と結合しているリガンドを除去し、次に不溶化した抗リガンド抗体に対する親和性が遊離リガンドよりも低い標識したリガンドの同族体を固相と接触させて固相上の抗体と結合させ、統いて洗浄操作を行い未反応の標識試薬を除去し、固相上に結合した標識量を測定することにより体液中の遊離リガンドを定量測定する方法に関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明において、リガンドに対する抗体は、当業者には周知の一般的なハプテンに対する抗体作成法によって得られる。すなわち、リガンドに対する抗体は、リガンドを牛血清アルブミンやキーホールヘモシアニンなどのキャリアータンパク質にカルボジイミド法やマレイミド法などにより化学的に結合させた複合体を免疫源とし、ウサギ、牛、ウマ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ラット等に免疫して得られたポリクローナル抗体や細胞融合法によって確立されたモノクローナル抗体を用いることが可能である。こうして得られた抗体は、リガンドに対する親和力よりも、リガンドを蛍光物質や酵素などにカルボジイミド法やマレイミド法などで結合させた標識試薬の方により強い親和力を示す場合が多い。この為、従来の2ステップ競合法による遊離リガンドの測定では、第二反応において、リガンドと固相上の抗体に結合しているリガンドに標識リガンドが置き換わる。その結果として、最終的に検出される標識量は、真の値よりも上昇しSN比（シグナル・ノイズ比：ゼロ濃度標準液と試料の示す標識量の比）と測定精度が悪化する。

【0008】本発明において、抗体を不溶化する固相は、磁性微粒子、マイクロタイタープレート、ポリスチレンボール、ポリスチレンチューブ、ガラスビーズなど従来用いられているものがすべて使用でき、材質についても何ら制限はない。また、抗体を固相に不溶化する方法は、共有結合、物理的吸着、ビオチン-アビジン結合、抗原抗体反応などを利用すれば良い。これらの方は、広く一般的に利用され多くの成書や報告がある。

【0009】本発明における、固相上の抗体と試料中の遊離リガンドとの反応（第一反応）は、平衡状態をなるべく崩さない条件で実施されるべきであり、反応液中にアリノナフタレンスルホン酸アンモニウムといった解離剤やリガンド受容体を添加することは好ましくなく、かつ反応時間も短く設定されるべきで、好ましくは10分間以内、より好ましくは5分以内が良い。第一反応後

の洗浄操作は、一旦抗体に結合したリガンドが解離しなければ、精製水でも構わないが、好ましくは中性のリン酸緩衝液を用いるのが良い。

【0010】本発明において、遊離リガンドを測定する場合標識されるリガンドの同族体として、生体内におけるリガンドの合成・代謝経路上にある物質やリガンドにアルキル基や水酸基などを付加したり、リガンドのハロゲン基を別の基に置換した化学修飾物質が選択できるが、これらのリガンドの同族体は、抗リガンド抗体への親和性がリガンドに対するよりも低いことが必要である。例えば、甲状腺ホルモンの遊離T3（以下FT3と略す）の測定には、T3の同族体として、サイロキシン（以下T4と略す）、3',3',5'-トリヨードサイロニン（以下rT3と略す）、3',5'-T2、3,3'-T2、3,5-T2（ヨードサイロニンをT2と略す）、3-モノヨードサイロニン、3'-モノヨードサイロニン、サイロニン等のD体またはL体が使用でき、好ましくは3,5-L-T2を選択するのが良い。また、遊離T4（以下FT4と略す）を測定する場合、標識されるT4の同族体として、T3、rT3、3',5'-T2、3,3'-T2、3,5-T2、3-モノヨードサイロニン、3'-モノヨードサイロニン、サイロニン等のD体またはL体が使用でき、好ましくはT3を選択するのが良い。これらの同族体を標識する物質は、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフェオヌファターゼ、β-ガラクトシダーゼなどが使用できるが、好ましくは西洋ワサビペルオキシダーゼが良い。また、同族体に標識物を結合させる方法は、同族体のアミノ基又はカルボン酸を利用してカルボジイミド法やマレイミド法などで結合させることができる。こうした低分子抗原の標識技術は既に広く普及しており、多くの成書や報告がある。第二反応における標識試薬の置換反応を改善するために、こうして得られた標識試薬は、測定対象のリガンドに対する親和力よりも弱い親和力を示し、第二反応において固相上の抗体と結合しているリガンドと置き換わりにくくなり、測定精度の低下を防ぐことが出来る。

【0011】第二反応の反応時間は、短すぎると必要なシグナルが不足し、長すぎると置換反応を生じる可能性が高くなるので、実験的に最高のSN比が得られる点に設定するのが良い。また、第二反応後の洗浄操作は、一旦抗体に結合した標識試薬が乖離しなければ、精製水でも構わないが、好ましくは中性のリン酸緩衝液を用いるのが良い。

【0012】第二反応の洗浄後、それぞれの標識物にあった検出法、すなわち放射線量測定、蛍光測定、発光量測定及び酵素活性を測定し、同様な反応を遊離リガンド濃度既知の標準液を試料として行った際に得られた標準曲線と検出値を比較し試料中のリガンド濃度を算出する。

【0013】

【実施例】次に実施例及び比較例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

この実施例は、抗T3抗体不溶化磁性微粒子と西洋ワサビペルオキシダーゼ（以下PODと略す）標識T2を用い、FT3を測定する方法に関するものである。

(1) 抗T3抗体不溶化磁性微粒子の調製

抗T3抗体不溶化磁性微粒子は、特開平3-046565号公報に開示されている方法に従い調製した。すなわち、抗T3抗体不溶化磁性微粒子は、トシリ化磁性微粒子（Dynabead M-280、日本ダイナル社製）のトシリ基と市販の抗T3モノクローナル抗体（ヒツジ由来）のアミノ基を共有結合させた後で、1Mモノエタノルーアミンによる未反応トシリ基のブロッキング処理、続いて1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液による非特異吸着部位のブロッキング処理を行い調製した。最終的に調製した粒子は、0.1%牛免疫グロブリン及び0.1M NaClを含む0.05Mバルビタールリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0）で0.5mg/mlに希釈し測定に用いた。

【0014】(2) POD標識T2の調製

POD（東洋紡製）30mgを精秤し、0.1M NaClを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5）3mlに溶解した。これにN-サクシミジル3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP、ピアス社製）0.75mgをエタノール0.75mlに溶かした溶液の全量を加え混合し、25°Cで30分間反応させた。反応後、混合液をセファデックスG-25（ファルマシア製）に通し、0.1M NaClを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.5）で溶出させ、280nmの吸光度でモニタリングした最初のピークを集め2mlに濃縮する。この液にジチオスレイトール（シグマ社製）を50mMとなるように加え25°Cで30分間反応させた。反応後、混合液をセファデックスG-25（ファルマシア製）に通し、5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）で溶出させ、280nmの吸光度でモニタリングした最初のピークを集めSH基導入PODを得た。一方、T2（東京化成製）30mgを精秤しDMF30mlに溶かした。これに、 α -MBS（同人化学製）6mgをDMF0.6mlに溶かした溶液の全量を加え、25°Cで30分間反応させマレイミド化T2を得た。次にSH基導入PODと同量のマレイミド化T2を混合し、4°Cで16時間反応させた。反応後、混合液をセファデックスG-25（ファルマシア製）に通し、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）で溶出させ、280nmの吸光度でモニタリングした最初のピークを集めPOD標識T2を得た。最終的に調製したPOD標識T2は、

0.2%牛血清アルブミンを含む0.12Mバルビタールリン酸ナトリウム緩衝液（pH8.6）で200ng/mlに希釈し測定に用いた。

【0015】(3) 標準液の調製

8%牛血清アルブミン、0.15M NaCl含有0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）にT3を添加し、FT3濃度をFT3-MP「三井」キット（三井製薬工業製）で決定した。これらの測定濃度が約0.1, 0.6, 2.5, 8.0, 22.0pg/mlとなるように適時希釈し、標準液とした。

【0016】(4) 洗浄液の調製

Tween 20（シグマ製）1mlを0.1M NaClを含む0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8）11と混合し洗浄液とした。

【0017】(5) 発色液の調製

3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン（シグマ製）65mgに10mlのアセトンを加え溶かし、さらに0.01%過酸化水素含有0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液（pH3.8）を加え11とした。

【0018】(6) 測定法

各試験管に測定試料または標準液80 μ lを加え、さら抗T3抗体不溶化磁性微粒子液100 μ lを加え混合し、37°C、5分間加温した。各試験管に磁石を接し磁性微粒子を集め、上清を除いた後、洗浄液を800 μ l加え混合し、再び磁石に接し上清を除去した。各試験管にPOD標識T2液を200 μ l加え混合し、37°C、5分間加温した。次に、各試験管に磁石を接し磁性微粒子を集め、上清を除いた後、洗浄液を800 μ l加え混合し、再び磁石に接し上清を除去した。この洗浄操作を更に2回繰り返し、未反応のPOD標識T2を除去した。各試験管に発色液300 μ lを加え混合し、37°C、5分間酵素反応を行った。つづいて、酵素反応停止液として1N硫酸200 μ lを加え反応を停止させ、試験管に磁石を接し磁性微粒子を集め上清の450nmの吸光度を比色計を用いて測定した。図1（図1）に示したように各標準液におけるFT3濃度をX軸に、吸光度の相対値をY軸にプロットし、直線で結び検量線を作成した。この検量線から、測定試料のFT3濃度を読み取った。

【0019】(7) 測定間再現性

表1（表1）に示したように、3濃度の市販の管理用血清（日本バイオラッド社製）を5日間にわたって測定し、測定間の標準偏差（以下SDと略す）と変動係数（以下CVと略す）を指標に評価した。表1中、管理血清L、MおよびHのCVは、比較例1で18.4%、3.5%および2.2%、実施例1が4.1%、1.4%および0.7%を示し、実施例1のバラツキを示す尺度のCVが比較例1の約1/4～1/2となり大幅に低減された。

【0020】

【表1】

表1 検定間再現性試験

n	管理血清L		管理血清M		管理血清H		(pg/ml)
	実施例1	比較例1	実施例1	比較例1	実施例1	比較例1	
1	1.77	2.38	6.44	6.21	19.4	18.1	
2	1.65	2.03	6.53	6.5	19.3	18.4	
3	1.58	1.54	6.40	6.65	19.1	18.5	
4	1.66	1.60	6.63	6.69	19.1	19.1	
5	1.65	2.11	6.54	6.23	19.2	18.9	
平均値	1.66	1.93	6.51	6.46	19.2	18.6	
SD	0.068	0.356	0.090	0.227	0.130	0.400	
CV (%)	4.1%	18.4%	1.4%	3.5%	0.7%	2.2%	

【0021】(8) 最小検出感度

標準液 0.1 pg/ml を 9 重測定して求めた平均吸光度から吸光度の標準偏差を 2 倍して差し引いた吸光度値の示す濃度を最小検出感度と定義した。試験結果を表2(表2)に示した。その結果、最小検出感度は、比較

表2 最小検出感度

例1 0.60 pg/ml に対し、実施例1 0.15 pg/ml を示し、実施例1 の検出感度が比較例1 の約4倍向上し、大幅に改善された。

【0022】

【表2】

	実施例1			測定値(最小検出感度)
	濃度 (pg/ml)	450nmの 吸光度	SD	
標準液1	0.10	1.352	0.0100	
標準液2	0.59	1.171		
標準液3	2.27	0.857		
標準液4	7.88	0.298		
標準液5	21.8	0.035		
				測定値(最小検出感度)
標準液1-2SD	1.332	0.15pg/ml		

	比較例1			測定値(最小検出感度)
	濃度 (pg/ml)	450nmの 吸光度	SD	
標準液1	0.10	1.017	0.0145	
標準液2	1.02	0.964		
標準液3	3.12	0.824		
標準液4	9.29	0.545		
標準液5	27.1	0.247		
				測定値(最小検出感度)
標準液1-2SD	0.988	0.60pg/ml		

【0023】比較例1

市販の遊離T3測定試薬であるFT3-MP「三井」(三井製薬工業株式会社製)キットを使用し測定を行った。測定原理は、2ステップ競合免疫測定法であり、POD標識T3液と抗T3ヒツジポリクローナル抗体固定化磁性微粒子液を使用する以外は、実施例1と全く同じ試薬で構成されている。また、測定法と再現性試験、最小検出感度試験も実施例1と全く同じ方法でを行い結果を図1(図1)、表1(表1)、表2(表2)に示した。その結果から明らかのように検量線は、実施例1が比較例1よりも大幅に勾配の急なパターンを示しSN比が高いことが示された。また、測定間再現性試験では、実施例1のCVが、比較例1の約1/4~1/2程度に低くなり、実施例1の測定のバラツキが大幅に小さくなるこ

とが示された。更に、最小検出感度も実施例1が比較例1の1/4である0.15 pg/mlを示し、より低濃度まで測定可能であることが示された。

【0024】実施例2

この実施例は、抗T4抗体不溶化磁性微粒子と西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下PODと略す)標識T3を用い、FT4を測定する方法に関するものである。

(1) 抗T4抗体不溶化磁性微粒子の調製

抗T4抗体不溶化磁性微粒子は、実施例1と同様の方法を用い、磁性微粒子に抗T4ポリクローナル抗体(ウサギ由来)を不溶化し調製した。最終的に調製した粒子は、0.1%牛免疫グロブリン及び0.1M NaClを含む0.05Mバルビタールーリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)で0.5 mg/mlに希釈し測定

に用いた。

【0025】(2) POD標識T3の調製

実施例1と同様の方法を用いPOD(東洋紡製)にT3(シグマ社製)を結合し調製した。最終的に調製したPOD標識T3は、0.2%牛血清アルブミンを含む0.12Mバルビタールリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.6)で230ng/mlに希釈し測定に用いた。

【0026】(3) 標準液の調製

8%牛血清アルブミン、0.15MNaCl含有0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)にT4を添加し、FT4濃度をFT4-MP「三井」キット(三井製薬工業株式会社製)で決定した。これらの測定濃度が約0.03, 0.3, 0.8, 2.4, 7.2ng/dlとなるように適時希釈し、標準液とした。

(4) 洗浄液、発色液の調製

洗浄液と発色液は実施例1と同様にして調製した。

【0027】(5) 測定操作法

各試験管に測定試料または標準液50μlを加え、さら抗T4抗体不溶化磁性微粒子液100μlを加え混合し、37°C, 5分間加温した。各試験管に磁石を接し磁性微粒子を集め、上清を除いた後、洗浄液を800μl加え混合し、再び磁石に接し上清を除去した。各試験管

表3 測定間再現性試験

n	管理血清L		管理血清M		管理血清H		(ng/dl)
	実施例2	比較例2	実施例2	比較例2	実施例2	比較例2	
1	0.415	0.452	2.17	1.93	6.64	6.38	
2	0.464	0.369	2.22	2.52	6.95	5.98	
3	0.432	0.462	2.16	2.20	6.67	6.53	
平均値	0.437	0.428	2.18	2.21	6.75	6.30	
SD	0.0250	0.0510	0.033	0.293	0.168	0.286	
CV(%)	5.7%	11.9%	1.5%	13.3%	2.5%	4.5%	

【0031】(7) 最小検出感度

標準液 0.03pg/mlを9重測定して求めた平均吸光度から吸光度の標準偏差を2倍して差し引いた吸光度値の示す濃度を最小検出感度と定義した。試験結果を表4(表4)に示した。その結果、最小検出感度は、比

にPOD標識T3液を200μl加え混合し、37°C, 5分間加温した。次に、各試験管に磁石を接し磁性微粒子を集め、上清を除いた後、洗浄液を800μl加え混合し、再び磁石に接し上清を除去した。この洗浄操作を更に2回繰り返し、未反応のPOD標識T3を除去した。各試験管に発色液300μlを加え混合し、37°C, 5分間酵素反応を行った。つづいて、酵素反応停止液として1N硫酸200μlを加え反応を停止させ、試験管に磁石を接し磁性微粒子を集め上清の450nmの吸光度を比色計を用いて測定した。図2に示したように各標準液におけるFT4濃度をX軸に、吸光度の相対値をY軸にプロットし、直線で結び検量線を作成した。この検量線から、測定試料のFT4濃度を読み取った。

【0028】(6) 再現性試験

表3(表3)に示したように3濃度の管理用血清を3日間をにわたって測定し、測定間再現性を評価した。

【0029】管理血清L、MおよびHのCVは、それぞれ比較例2で11.9%、13.3%および4.5%、実施例2が5.7%、1.5%および2.5%を示し、実施例2のバラツキを示す尺度のCVが比較例2の約1/9~1/2と大幅に低減された。

【0030】

【表3】

較例2 0.20ng/dlに対し、実施例20.11ng/dlを示し、実施例2の検出感度が比較例2の約1/2に改善された。

【0032】

【表4】

表4 最小検出感度

	実施例2		
	濃度 (ng/dl)	450nmの 吸光度	SD
標準液1	0.03	0.867	0.0230
標準液2	0.28	0.722	
標準液3	0.75	0.425	
標準液4	2.39	0.140	
標準液5	7.63	0.067	
		測定値(最小検出感度)	
標準液1-2SD	0.821	0.11ng/dl	

	比較例2		
	濃度 (ng/dl)	450nmの 吸光度	SD
標準液1	0.03	1.006	0.0285
標準液2	0.28	0.920	
標準液3	0.75	0.695	
標準液4	2.39	0.393	
標準液5	7.63	0.278	
		測定値(最小検出感度)	
標準液1-2SD	0.949	0.20ng/dl	

【0033】比較例2

この比較例2は、上記実施例2のPOD標識T3をPOD標識T4に替え測定を行ったものである。POD標識T4は、T4（シグマ社製）を原料として使用する以外は、実施例2と全く同じ方法で調製し、9.1ng/mlの濃度に希釈し測定に用いた。他の試薬（抗T4抗体不溶化磁性微粒子、標準液、発色液、洗浄液等）は全く同じ方法で調製した。また、測定法と再現性試験、最小検出感度試験も実施例2と全く同じ方法で行い結果を図2（図2）、表3（表3）、表4（表4）に示した。その結果から明らかなように検量線は、実施例2が比較例2よりも勾配の急なパターンを示しSN比が高いことが示された。また、測定間再現性試験では、実施例2のCVが比較例2の約1/9～1/2となり、実施例2の測定のバラツキが大幅に小さいことが示された。更に、最小検出感度も実施例2が比較例の約1/2である0.11ng/dlを示し、より低濃度まで測定可能であることが示された。

【0034】

【発明の効果】本発明による測定方法に従うと、従来の2ステップ免疫競合法に比べ最小検出感度と測定間再現性が大幅に良化し、測定精度が飛躍的に改善される。すなわち、FT3の測定では、従来法と比較し本発明の測

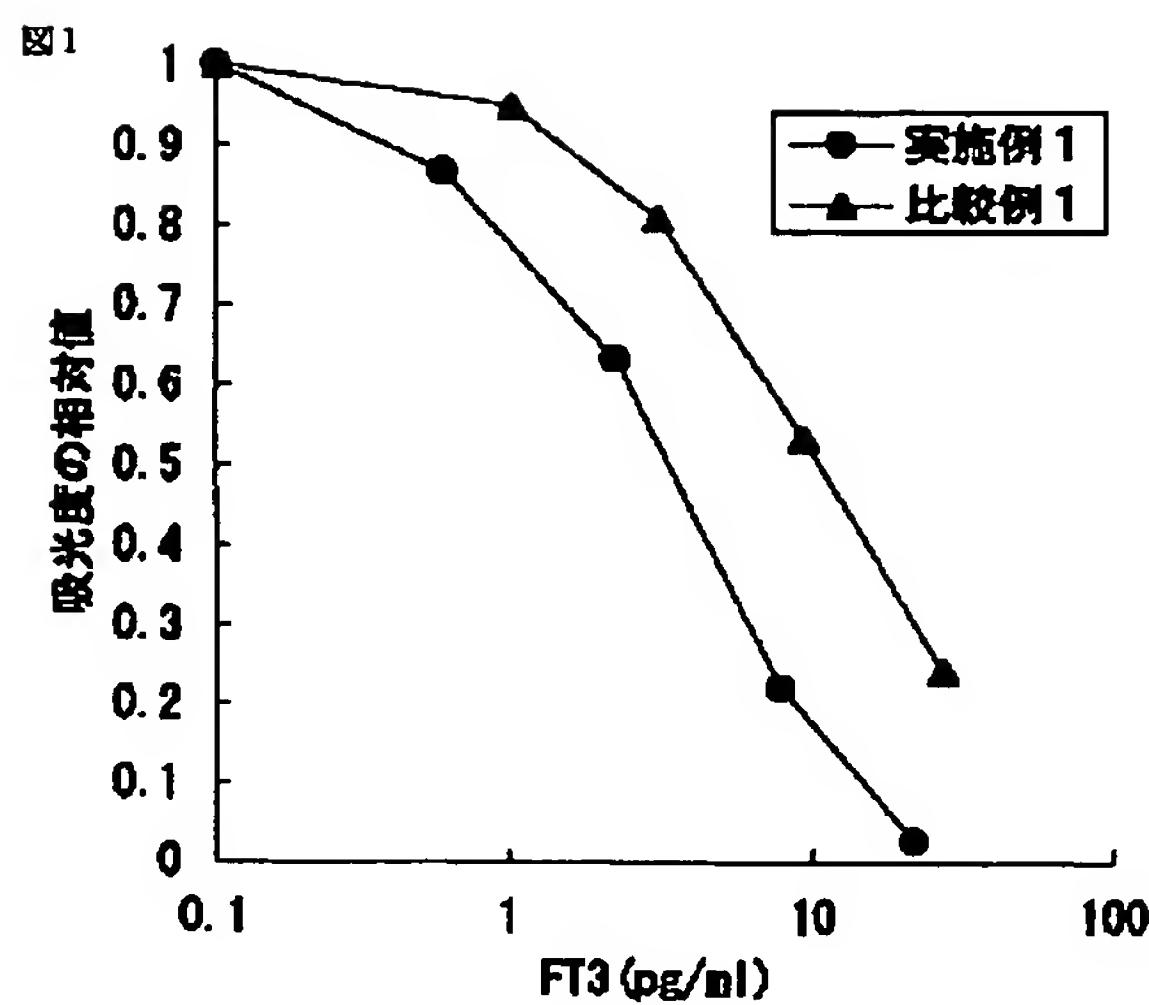
定方法が最小検出感度で4倍向上した0.15pg/mlを示した。同じくFT3の測定間再現性は、測定のバラツキを示すCV値が約4倍向上した。その結果として、甲状腺機能低下症を代表とする血清中のFT3濃度が低い疾患と健常者のFT3濃度は、従来法では測定精度が不足したびとび健常者の濃度を高く示す逆転現象を認めたが、本発明による測定方法により逆転現象が大幅に減少した。また、本発明は、従来の2ステップ免疫測定法の特長である内因性受容体の影響を受けない利点をそのまま引き継いでいるので、上記の測定精度の大幅な向上とあわせ、臨床的な有用性が非常に高い画期的な測定法である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1と比較例1におけるFT3標準液の検量線を示すグラフである。X軸にFT3濃度を対数軸でプロットし、Y軸に標準液0.1pg/mlの吸光度を1とした時の各点の吸光度の相対値をプロットした。

【図2】本発明の実施例2と比較例2におけるFT4標準液の検量線を示すグラフである。X軸にFT4濃度を対数軸でプロットし、Y軸に標準液0.03ng/mlの吸光度を1とした時の各点の吸光度の相対値をプロットした。

【図1】



【図2】

